

## ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И ДОНОРОВ NO НА АКТИВНОСТЬ Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы АОРТЫ КРЫСЫ

Акопова О.В., Харламова О.Н., Вавилова Г.Л., Сагач В.Ф.

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

### Введение

В широком спектре физиологических функций оксида азота (NO) наиболее изучена его роль как одного из ключевых факторов регуляции сосудистого тонуса [1]. В то же время, имеющиеся в литературе данные по действию NO на ионные механизмы контроля сосудистого тонуса, в частности, обеспечивающие поддержание мембранного потенциала эндотелия, не вполне исчерпывающи. Одним из таких механизмов является Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФаза - фермент, осуществляющий противогradientный электрогенный транспорт Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> через плазматические мембраны клеток и участвующий таким образом в регуляции мембранного потенциала эндотелия.

Согласно литературным данным, существует возможность прямого (путем образования S-нитрозопроизводных и других продуктов окисления SH-групп) [2] и опосредованного [3] действия NO на активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы. Однако, эти данные, показывающие как активацию [3], так и ингибирование фермента [2], достаточно противоречивы. Такая неоднозначность не позволяет вполне адекватно оценить роль NO в функционировании Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы.

Поэтому для оценки влияния NO на активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы, одного из звеньев в системе контроля сосудистого тонуса, нами была поставлена задача оценить *in vitro* действие доноров NO – нитропрусида Na и нитроглицерина а также биологического предшественника NO, L-аргинина, на активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы аорты крысы.

### Материалы и методы исследования

Активность Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы определяли в гомогенате ткани аорты в среде следующего состава (в mM): 25 трис-HCL буфер, 5 MgCl<sub>2</sub>, 100 NaCl, 10 KCl, 3 Na<sub>2</sub>АТФ, pH 7,4 в объеме 1 мл. Количество белка определяли по Лоури. Пробу гомогената (100-120 мкг белка) прединкубировали в течение 15 мин с заданными концентрациями L-аргинина и других реагентов. Затем вносили остальные компоненты реакционной среды. Реакцию начинали добавлением АТФ и проводили в течение 10 мин при 37° С, а затем останавливали добавлением Ds-Na до конечной концентрации 0,3%. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазную активность определяли по приросту неорганического фосфора (P<sub>i</sub>) методом Фiske – Суббароу как разность

между общей  $Mg^{2+}, Na^+, K^+$ -АТФазной активностью и  $Mg^{2+}$ -АТФазной активностью и выражали в мкмоль  $P_i$  на 1 мг белка за 1 час.

В работе использованы следующие реагенты: додецилсульфат Na, трис (основание), "Serva", (ФРГ),  $Na_2ATP$ , "Reanal", (Венгрия), L-аргинин, D-аргинин, L-NAME ( $N^G$ -нитроаргинин, метиловый эфир), нитропруссид Na, "Sigma" (США) и реактивы отечественного производства марки ч.д.а.

### *Результаты и их обсуждение*

Влияние L-аргинина и доноров NO изучали в широком диапазоне концентраций,  $10^{-6}$ - $10^{-3}$  М. В результате проведенного эксперимента было установлено, что действие L-аргинина и доноров NO на  $Na^+, K^+$ -АТФазу аорты крысы носит дозо-зависимый характер. При этом обнаруживается активация  $Na^+, K^+$ -АТФазы низкими концентрациями L-аргинина и нитропруссида Na,  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  М, и ингибирование фермента относительно высокими,  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  М, концентрациями L-аргинина и доноров NO.

Так, наиболее выраженное активирующее действие L-аргинина составляло +28,8% ( $10^{-5}$  М,  $p < 0,01$ ). Подобную тенденцию к активации  $Na^+, K^+$ -АТФазы на 21,6% обнаруживал и нитропруссид Na ( $10^{-6}$  М,  $p < 0,05$ ). С повышением концентрации действие L-аргинина и доноров NO становится ингибиторным. Ингибирование  $Na^+, K^+$ -АТФазы L-аргинином при  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  М составляет, соответственно, -32,3% ( $p < 0,01$ ) и -37,1% ( $p < 0,001$ ). Подобное действие производит и нитроглицерин: -34,5% ( $10^{-4}$  М,  $p < 0,05$ ) и -42,8% ( $10^{-3}$  М,  $p < 0,001$ ), а также – нитропруссид Na, в присутствии которого активность  $Na^+, K^+$ -АТФазы снижалась на 29,8% ( $10^{-3}$  М,  $p < 0,01$ ).

Установлено, что угнетение активности  $Na^+, K^+$ -АТФазы L-аргинином снимается в присутствии L-NAME, ингибитора биосинтеза NO, что свидетельствует об участии NO в ингибировании  $Na^+, K^+$ -АТФазы аорты относительно высокими,  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  М, концентрациями L-аргинина. При этом сам по себе L-NAME не ингибирует  $Na^+, K^+$ -АТФазу, но так же, как и L-аргинин в низких концентрациях активирует фермент (+25,6%,  $10^{-6}$  М,  $p < 0,01$ ).

Влияние L-аргинина на  $Na^+, K^+$ -АТФазу осуществляется и на мембранном уровне. Так, активация  $Na^+, K^+$ -АТФазы L-аргинином в микросомах коры почки крысы была еще более выраженной, чем в препаратах аорты (+35,6%,  $10^{-6}$  М,  $p < 0,01$ ). Эффект устранялся после обработки микросом дезоксихолом Na, что позволяет предположить действие L-аргинина не непосредственно на фермент, а на определенные мембранные структуры, модификация либо удаление которых может происходить после обработки мембранных препаратов. Подобно L-аргинину, нитроглицерин, который значительно угнетает активность  $Na^+, K^+$ -

АТФазы аорты (-34,5% и -42,8% при  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  М), не влияет на активность обработанных детергентом микросом коры почки. То же наблюдается и для нитропруссиды Na.

Таким образом, результаты эксперимента позволяют говорить о влиянии не только экзогенного (с введением доноров NO), но также и эндогенного (стимулированного L-аргинином) оксида азота на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы аорты *in vitro*. При этом действие относительно высоких концентраций L-аргинина и доноров NO угнетает активность фермента.

Влияние L-аргинина на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы носит разнонаправленный характер, однако, только ингибирование фермента L-аргинином, согласно нашим данным, можно связать с действием NO в изучаемых препаратах аорты.

Отсутствие какого-либо влияния L-аргинина и доноров NO на активность  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в очищенных мембранных препаратах указывает на участие определенных опосредующих механизмов в ингибировании  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы этими агентами.

Полученные результаты дают основание предполагать достаточно сложную взаимосвязь между содержанием L-аргинина в организме, интенсивностью эндогенного синтеза NO и активностью  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы *in vivo*, в особенности, при патологических состояниях, сопровождающихся недостаточной либо избыточной продукцией NO. Так, вероятным представляется допущение, что в условиях ингибирования биосинтеза NO *in vivo* может происходить активация  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, что подтверждается и литературными данными [4]. И напротив, угнетение  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы высокими дозами NO в условиях его гиперпродукции (например, при эндотоксиновом шоке) может вызвать нарушение ионных механизмов регуляции мембранного потенциала клеток и его снижение, что в итоге ведет к утрате функциональной активности эндотелия.

#### Литература

1. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М., Соловйов А.І., Базілюк О.В., Жукова А.В., Ткаченко М.М., Марченко С.М. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця // Фізіол. Журн. - 1997. - Т.43, №1-2. - С.3-18.
2. Boldyrev A.A., Bulygina E.R., Kramarenko G.G., Vanin A.F. Effect of nitroso compounds on Na/K-ATPase // Biochim.Biophys.Acta - 1997. - V.1321. - P. 243-251.
3. Gupta S., McArthur C., Grady Ch., Ruderman N. Stimulation of vascular  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect // Am. J. Physiol. - 1994. - V.266. - P.H2146-H2151.

4. Kang D.G., Kim J.W., Lee J. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the Na,K-ATPase activity in the kidney //Pharmacol. Res. - 2000. - V.41. - P.121-125.

## МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ОКСИДА АЗОТА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ

Андрухов О.Я., Сагач В.Ф.

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

### *Введение*

Вещества эндотелиального происхождения играют важную роль в регуляции сосудистого тонуса [1]. Одним из таких веществ является оксид азота (NO). NO является одной из наименьших биологически активных веществ, которое может легко диффундировать через мембранный барьер, что делает его удобным посредником в регуляции местных сосудистых реакций. Оксид азота вызывает расслабление сосудистых гладких мышц (ГМ). Основным механизмом такого действия NO считается активация растворимой гуанилатциклазы, что приводит к возрастанию внутриклеточного уровня цГМФ и активации специфического фермента цГМФ-зависимой протеинкиназы [3]. Это в конечном итоге приводит к расслаблению ГМ вследствие уменьшения  $[Ca^{2+}]_i$  и увеличения активности фосфатазы легких цепей миозина. Однако цГМФ-зависимый механизм не является единственным. NO может также непосредственно активировать  $Ca^{2+}$ -зависимые калиевые каналы [2]. Данный цГМФ-независимый механизм также не является единственным, так как доноры NO вызывают расслабление препаратов ГМ животных с отсутствующим геном цГМФ-зависимой протеинкиназы и при условии блокады  $Ca^{2+}$ -зависимых калиевых каналов [4], что говорит о существовании еще не изученных механизмов действия оксида азота в ГМ. Цель настоящей работы состояла в исследовании механизмов дилататорного действия оксида азота, не связанных с активацией цГМФ-зависимого сигнального пути.

### *Материалы и методы исследования*

Исследования проводились на изолированных интактных и скинированных препаратах воротной вены и аорты крыс линии Вистар массой 200-250г. Сосудистые препараты помещали в термостатированную камеру, растягивали с силой 4-6 мН в случае воротной вены и 15-20 мН в случае аорты, перфузировали стандартным раствором Кребса